



TITLE:

# 錯体化学を基盤とした高感度蛍光 プローブの開発( Abstract\_要旨 )

AUTHOR(S):

赤岡, 一志

---

CITATION:

赤岡, 一志. 錯体化学を基盤とした高感度蛍光プローブの開発. 京都大学  
, 2015, 博士(人間・環境学)

ISSUE DATE:

2015-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19067>

RIGHT:

京都大学	博士（ 人間・環境学 ）	氏名	赤岡 一志
論文題目	錯体化学を基盤とした高感度蛍光プローブの開発		
(論文内容の要旨)			
<p>ケミカルバイオロジーは、分子生物学的な手法に加えて有機化学的な手法を駆使して、核酸やタンパク質などの重要な生体物質の機能や反応を分子レベルで解き明かす現在注目される研究領域である。その中で、それら生体物質の動態を鮮明に可視化するには生体物質と特異的に結合して蛍光を発する蛍光プローブが必要である。そこには、細胞内在性蛍光物質や励起散乱光の影響による検出感度の低下の問題もある。既報の蛍光プローブは単純な有機分子を基盤としており、これらの問題を完全に解決するには至っていない。しかも生体環境は複雑かつ多様であり、標的を特異的に検出する普遍的手法はなく、個々の標的に対して至適な分子設計が必須である。本研究では、錯体化学を基盤として数種の金属イオンに対する高感度蛍光プローブを開発し、その分子設計指針の確立を試みた。その際、金属錯体を含む分子設計による機能付加を目指した。</p> <p>本論文は、蛍光イメージング研究の現状と課題を論述した序論に始まり、実際の実験研究を記述する第1章から第3章で構成されている。</p> <p>第1章では、希土類錯体がもつ長残光特性を利用した高感度亜鉛蛍光プローブの開発と、それによる時間分解型蛍光（TRL）イメージング法への適用について2節に分けて記述している。</p> <p>第1節では、ペプチド鎖の中央に亜鉛イオン配位部位を配置し、一方の末端にテルビウム錯体を導入し、もう一方の末端にアンテナ色素を導入したTRL型亜鉛プローブTbOTZの開発を記述している。TbOTZが亜鉛イオンに配位するとペプチド鎖が折れ曲がり、その両末端が接近する。その結果、アンテナ色素からテルビウム錯体へのエネルギー移動が増大し、テルビウム錯体の発光が強まる分子設計である。実際、TRL測定によって高感度で亜鉛イオンが検出され、金属選択性も十分であることが確かめられた。さらに、レシオ測定によって亜鉛イオン濃度の定量も可能であることも実証された。</p> <p>第2節では、光誘起電子移動（PET）機構による発光制御を実現したTRL型亜鉛蛍光プローブEuTRL-1の開発を記述している。EuTRL-1は亜鉛イオン配位部位、アンテナ色素、ユーロピウム錯体から構成される。ここで、アンテナ色素へのPETドナーである窒素原子が亜鉛イオンに配位する構造をもつ。実際、亜鉛イオンを添加すると、亜鉛イオン添加前に比較して100倍以上の蛍光増大が確認された。亜鉛イオンがないときは、PET機構によってアンテナ色素の一重項励起状態は完全に消失していた一方、亜鉛イオンが存在すると、PET機構が効率的に抑制されたと結論づけている。次に、本プローブを用いて細胞内亜鉛イオンの検出実験を実施したところ、明瞭なイメージング画像を取得した。このとき、ユーロピウム錯体部位に親水的なカルボキシレートイオンを複数もつことが活かされた。カルボキシ基をアセトキシメチルエステル化したプローブは細胞膜透過性が高まり、細胞内へ効率よく導入され、続いて細胞内で加</p>			

水分解され、そのまま細胞内に保持された結果であると論述している。また、この実験では光源と測定プログラムを工夫して、自ら構築したTRLイメージングシステムを用いている。

第2章では、銅(I)イオンが起こす反応を利用した高感度銅蛍光プローブの開発を記述している。ここでは、ミトコンドリアに集積する機能を付与することを含めて、所属研究室が既に報告している銅(I)イオンの蛍光プローブFluTPAのさらなる改良を目的として、新規銅(I)イオン蛍光プローブRdlTPA-TPPを設計した。反応生成物の質量分析とHPLC分析の結果、想定したベンジルエーテルの酸化的切断によって蛍光色素が生成することを実証している。ここで、従来型プローブが還元型ロイコ色素を基盤とするのに対して、RdlTPA-TPPはスピロ環型ロイコ色素を基盤とすることにより酸化反応のステップを省略できることを実証した。次に、生細胞を用いたイメージング実験を実施した。その結果、正電荷をもつトリフェニルホスホニウム基によってプローブはミトコンドリアに集積し、その近傍の銅(I)イオンの検出が可能であることを実証した。

第3章では、水銀イオンに対してきわめて高い親和性をもつ水銀蛍光プローブRosHgの開発を記載している。これは、所属研究室で既に報告している銀イオンプローブに関する知見に基づくものである。すなわち、金属配位部位に六つのチオエーテル基を導入することによって、水銀イオンに対する親和性と選択性を高めた。事実、これによりfM ( $10^{-15}$ M) オーダーというきわめて低濃度の水銀イオン検出が可能なことを実証した。また、生細胞を用いてRosHgによるイメージング実験を実施して、細胞内水銀イオンのイメージング画像を取得した。さらに、実験条件を変更することによって、水銀を解毒する細胞内チオール濃度の変化も追跡できることを実証した。

(論文審査の結果の要旨)

申請者は、数種の細胞内金属イオンの動態解明に貢献するツール分子の開発を目指し、各種蛍光プローブの合成法とそれが備えるべき物性に関して基礎的研究を実施した。さらに、生細胞を用いてイメージング画像を取得して、その実用性を実証した。具体的には、時間分解型蛍光 (TRL) 亜鉛プローブ (第1章)、反応触媒型銅蛍光プローブ (第2章)、及び水銀蛍光プローブ (第3章) を研究対象に取り上げた。そこには、錯体化学を基盤とした分子設計思想があり、その着眼の妥当性は実験により支持されたと評価できる。また、全体を通して合成計画は合理的であり、物質の同定は確実に信頼できる。

第1章第1節では、ペプチド鎖の中央に亜鉛イオン配位部位を配置し、一方の末端にテルビウム錯体を導入し、もう一方の末端にアンテナ色素を導入したTRL型亜鉛プローブTbOTZの開発を記述している。すなわち、TbOTZが亜鉛イオンに配位するとペプチド鎖が折れ曲がり、その両末端が接近する分子設計である。この設計ではペプチドを構成するアミノ酸の選択が鍵となるが、ヒンジ部に $\beta$ ターン構造をとるグリシンとプロリンを配置し、そこから、亜鉛イオンに配位するヒスチジン数分子を伸長した構造は適切と判断される。事実、亜鉛イオン添加時に蛍光強度の増大が観測され、両端に存在するアンテナ色素とテルビウム錯体が期待通り接近したことが実証された。また、亜鉛イオンとの親和性は結合解離定数で定量的に評価されており、金属イオン選択性の検証も綿密である。さらに、亜鉛プローブで往々にして問題となるカドミウムとの競合もないことを実証している。これらの事実から、申請者の分子設計は合理的であると評価できる。また、申請者が提案するレシオ測定による亜鉛イオン濃度の定量も十分期待できる。

第1章第2節では、光誘起電子移動 (PET) 機構による発光制御を実現したTRL型亜鉛プローブEuTRL-1の開発を記述している。この分子の特徴の一つは、亜鉛イオンに配位する窒素原子がアンテナ色素を構成するベンゼン環に直結している点である。そのため、亜鉛イオンに配位すると色素のHOMOエネルギーが大きく低下して、PET機構が抑制されるという申請者の推定は合理的である。事実、亜鉛イオンを添加すると、亜鉛イオン添加前に比較して100倍以上の蛍光増大が確認されたことによって、この考えは支持された。続く生細胞を用いるイメージング実験においては、プローブの細胞膜透過性が問題となる。すなわち、親水的分子を一時的に疎水的にする必要があり、カルボキシ基をアセトキシメチルエステルにすることにより達成している。また、光源に安価なLEDを用いたイメージングシステムを自ら構築した点も高く評価できる。このとき測定プログラムを十分吟味しているため、取得されたイメージング画像は鮮明である。

第2章では、銅(I)イオンが起こす反応を利用した高感度銅蛍光プローブの開発について記述している。この基本設計は所属研究室で既に報告しているものであるが、還元型ロイコ色素を基盤とするため、ベンジルエーテルの酸化的切断とフルオレセイン骨格の酸化の二段階が必要であった。申請者は、プローブの酸化状態は変えずにスピロ環を形成させることによってロイコ色素とした。その結果、酸化反応のステップを省略でき、所期の目的を達成した。一方、ベンジルエーテルが切断さ

れなくとも溶液のpHが低下するだけで発色する問題が出てくる．そのため、pH変化に対して綿密な測定を実施し、それは生理的条件下でのイメージング画像取得には問題とならないことを実証している．また、トリフェニルホスホニウム基を導入したプローブがミトコンドリアに集積することの証明も十分であり、その際、リソソームの発色についての考察も合理的である．

第3章では、水銀イオンに対してきわめて高い親和性をもつ蛍光プローブRosHgの開発について記載している．水銀イオンの捕捉に六つのチオエーテル基を導入したことはきわめて合理的であり、事実、水銀イオンに対して高い親和性と選択性が観測された．ここで、fM ( $10^{-15}$ M) オーダーの水銀イオンの検出が可能であることは高く評価できる．また、生細胞を用いたRosHgによるイメージング画像は鮮明であり、実用性の高さを実証している．このとき、水銀を解毒する細胞内チオールに着目したことも高く評価される．

以上のように、本学位申請論文は生体の重要なイオン種のプローブ分子研究において、新たな局面を切り開いたものと評価できる．なお、本論文を構成する重要な部分は既に学会誌に掲載され、高い評価を受けている．

また本学位申請論文は、人間と環境との良好な関係を創生する自然科学考究を目的とする相関環境学専攻 分子・生命相関論講座の理念にかなったものと言える．

よって、本論文は博士（人間・環境学）の学位論文として価値あるものと認める．また、平成27年1月13日、論文内容とそれに関連した事項について諮問を行なった結果、合格と認めた．

要旨公表可能日： 平成 年 月 日以降